动 物 学 研 究 2013，Oct. 34(5): 519−530 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI:10.11813/j.issn.0254-5853.2013.5.0519

Kisspeptin 调控鱼类生殖内分泌的研究进展

卓 琦*

吉首大学 城乡资源与规划学院武陵山区动物种质资源研究所，湖南 张家界 427000

摘要：Kisspeptin 是近 10 年新发现的调控动物生殖内分泌的关键因子，是 *kiss* 基因所编码的多肽产物，属神经内分泌肽类激素，为 G 蛋白偶联受体 54（GPR54）的内源性配体。Kisspeptin 具多个功能性的分子结构形态，在鱼类中，主要结构形式为 Kisspeptin-10 肽。Kisspeptin/GPR54 系统在生殖中具重要功能。该文综合现有研究资料，就 Kisspeptin 在鱼类生殖内分泌调控中的概况、Kisspeptin 神经元在鱼脑中的分布和定位、鱼类 Kisspeptin 分子的多态性、Kisspeptin 调控鱼生殖内分泌的功能多样性、Kisspeptin 调控鱼类生殖内分泌的机制、Kisspeptin 的分子进化以及 Kisspeptin 和其他功能分子对鱼类生殖内分泌的协同调控进行了初步阐述，同时对 Kisspeptin 在鱼类生殖内分泌调控中的研究进行了展望。

关键词：亲吻素；神经激肽 B；促性激素释放抑制激素；生殖；内分泌；G 蛋白偶联受体 54
中图分类号：Q175 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2013)05-0519-12

Advances in the study of neuroendocrinological regulation of kisspeptin in fish reproduction

Qi ZHUO*

Institute of Animal Germplasm Resources of Wuling Mountain Area, College of Urban-rural Resources and Planning Science, Jishou University, Zhangjiajie 427000*, China*

Abstract: Kisspeptin, a key factor in the neuroendocrinological regulation of animal reproduction, is a peptide product encoded by *kiss* genes, which act as the natural ligand of GPR54. Over the last decade, multiple functional molecular forms of kisspeptin have been found in vertebrate species. In fish, the major molecular structural form is kisspeptin-10. The kisspeptin/GPR54 system has multiple important functions in reproduction. This review provides an overview of our current knowledge on kisspeptin and its role in regulating fish reproductive, including the distribution and location of kisspeptin neurons in the brain, the molecular polymorphism of fish kisspeptin, functional diversity, the molecular mechanism of fish reproductive regulation, and the molecular evolution of kisspeptin as well as the co-regulation of fish reproduction by kisspeptin and other functional molecules. Perspectives on the future of kisspeptin regulation in fish reproduction are also highlighted.

Keywords: Kisspeptin; NKB; GnIH; Reproduction; Endocrinology; GPR54

肿瘤转移抑制因子Kisspeptin又称亲吻素或吻素，其前身又称Metastin，是*kiss*基因所编码的多肽产物，属神经内分泌多肽激素。在脊椎动物中，具多个功能性配体。该激素最早由Lee et al（1996，1997）发现于乳腺癌细胞和黑色素瘤细胞系。1999年，编码G蛋白偶联受体-54（G protein-coupled receptor-54, GPR54）的*gpr54*基因相继在大鼠和人类中被确认，同时还确立了Kisspeptin为GPR54受体的天然配体（Kotani et al, 2001; Lee et al, 1999; Muir et al, 2001）。然而，该激素在脊椎动物生殖中的作用7年后才浮出水面。2003年，国外报道了Kisspeptin受体GPR54突变将导致小鼠丧失生殖功能，并引发低促性腺激素性功能减退症，与此同时，敲除小鼠*kiss*或*gpr54*均将对下丘脑—垂体—性腺轴（BPG轴）功能造成严重影响，从而确立了Kisspeptin/GPR54系统在脊椎动物生殖中的重要地位（Funes et al, 2003; Seminara, 2003; d' Anglemont et al, 2007; Lapatto et al, 2007）。之后，Kisspeptin/GPR54系统

收稿日期：2013-03-21；接受日期：2013-05-28
基金项目：国家自然科学地区基金（31260634）、吉首大学科技计划（jsdxxcfxbskyxm201102）
*通信作者（Corresponding author），E-mail: zhuohuiyuan@qq.com
第一作者简介：卓琦（1962–），男，湖南慈利人，博士，副教授，主要从事水产动物生殖生理研究

成为了脊椎动物生殖内分泌研究的热点。研究者最早从人类中确立了Kisspeptin的4种成熟肽，即kisspeptin-54、-14、-13、-10，并认为这4种成熟肽具有相同的生物活性（Kotani et al, 2001; Muir et al, 2001; Ohtaki et al, 2001）。随后又有学者报道了Kisspeptin-12和Kisspeptin-15的存在（Lee et al, 2009）。Kisspeptin神经元主要定位于弓状核及前腹侧室旁核，并发出轴突支配表达*gpr54*的GnRH神经元（Irwig et al, 2005; Matsui et al, 2004）。

Kisspeptin/GPR54系统的发现极大地促进了人们对生殖内分泌调控的认识，其中包括青春期启动的分子定时、性类固醇激素对促性腺激素分泌的正/负反馈调控、性别二态性的发生机制、季节性繁殖的生殖内分泌调控以及能量平衡和生殖的整合（Kauffman et al, 2007; Popa et al, 2008）等。本文综合现有研究资料，就Kisspeptin调控鱼类生殖内分泌的研究进行总结。

1 Kisspeptin在鱼类生殖内分泌调控中的研究概况

Kisspeptin/GPR54 系统对鱼类生殖神经内分泌调控的研究起步较晚。Parhar et al（2004）首次报道了*gpr54*和*gnrh*在罗非鱼（*Oreochromis niloticus*）神经元中存在共表达，为 Kisspeptin/GPR54 参与鱼类生殖调控和青春期启动，及其与促性腺激素释放激素（GnRH）间存在的紧密联系提供了第一证据。van Aerle et al（2008）首次采用生物信息学手段于斑马鱼（*Danio rerio*）、红鳍东方鲀（*Takifugu rubripes*）、青斑河豚（*Tetraodon nigroviridis*）、青鳉（*Oryzias latipes*）及七鳃鳗（*P. marinus*）中确认了*kiss1* 基因及其表达产物 Kiss1，Kanda et al（2008）又对青鳉*kiss1*基因及其表达产物Kiss1进行了功能研究。还有学者分别从斑马鱼、青鳉以及欧洲海鲈（*Dicentrarchus labrax*）中鉴定了编码 Kisspeptin 的两种 *kiss* 基因的存在并分别命名为 *kiss1* 和 *kiss2*（Kitahashi et al, 2009; Felip et al, 2009），*kiss2* 表达产物 Kiss2 多肽能够刺激性成熟雄性斑马鱼垂体LHβ-亚单位和 FSHβ-亚单位 mRNA 的表达（Kitahashi et al, 2009）。Li et al（2009）对金鱼（*Carassius auratus*）kisspeptin/GPR54 的结构与功能多样性进行了研究。Felip et al（2009）在欧洲海鲈中发现，Kiss1 和 Kiss2 均可诱导 LH 和 FSH 的分泌。与此同时，鱼类 GPR54 的两种 *gpr54* 基因及其表达受体也在斑马鱼中被确认（Biran et al, 2008）。然而，单一鱼类两种配体及其两种同源受体之间的相互作用尚缺乏系统研究。到目前为止，斑马鱼（van Aerle et al, 2008; Kitahashi et al, 2009）、红鳍东方鲀、青斑河豚（van Aerle et al, 2008）、青鳉（Kanda et al, 2008; Kitahashi et al, 2009）、金鱼（Li et al, 2009; Servili et al, 2011）、星点东方鲀（*Takifugu niphobles*）（Shahjahan et al, 2010）、斜带石斑鱼（*Epinephelus coioides*）（Shi et al, 2010）、日本鲭（*Scomber japonicus* ）（Selvaraj et al, 2010）、条纹鲈（*Morone saxatilis* ）（Zmora et al, 2012）、欧洲海鲈（Felip et al, 2009; Migaud et al, 2012）、塞内加尔鳎（*Solea senegalensis*）（Mechaly et al, 2012）及刺鱼（stickleback）编码 Kisspeptin 的基因已被分离得到，所有这些鱼类均具有 *kiss2*，而斑马鱼、青鳉、金鱼、条纹鲈、欧洲海鲈和日本鲭则同时还具有 *kiss1*（Felip et al, 2009; Kitahashi et al, 2009; Servili et al, 2011; Yang et al, 2010）。还有证据显示，*kiss1* 和 *kiss2* 亦存在于软骨鱼类姥鲨（*Callorhinchus milii*）及七鳃鳗中（Um et al, 2010），而在塞内加尔鳎还检测到了通过不同剪接方式形成的两种 *kiss2* 转录本亚型。此外，在非洲爪蟾（*Xenopus tropicalis*）中发现了 3 种形式的 *kiss* 基因，而在绿安乐蜥（*Anolis carolinensis*）中仅发现了 *kiss2* 的存在（Akazome et al, 2010; Felip et al, 2009; Um et al, 2010）。

2 Kisspeptin在鱼类中的分布和定位

表达 kisspeptin 的神经元在脊椎动物中多见于下丘脑不同的核以及其他脑区，且不同种类的分布、调控和功能也各异。近年来，研究者对鱼类Kisspeptin 的分布定位进行了研究。*kiss1* 原位杂交显示，青鳉下丘脑中至少存在两群表达 *kiss1* 的Kiss1 神经元群，分别位于腹侧结节核（nucleus ventralis tuberis;NVT）及下丘脑后室周核（nucleus posterioris periventricularis; NPPv）（Kanda et al, 2008; Oka, 2009），且 NVT 中的 KISS1 神经元表现明显的性别二态性，即，繁殖期雄鱼 Kiss1 神经元的数量要高于雌鱼，而 NPPv 中的神经元群数量则不表现性别二态性。同时，Kanda et al（2008）还考察了青鳉 NVT 及 NPPv 中的 Kiss1 神经元群数量是否受性类固醇激素影响，结果发现，NVT 中的Kiss1 神经元群在切除卵巢后几乎为零，在雌激素

刺激下，可再次恢复正常，而 NPPv 中的 Kiss1 神经元数量则不然，因此推测，*kiss1* 表达于 NVT 中，而非 NPPv，且 NVT 中的 Kiss1 神经元受卵巢雌激素的正反馈调节。此外，虽然青鳉 NVT 中的 Kiss1 神经元数量雄鱼高于雌鱼，而小鼠 AVPV 中 Kiss1 的神经元数量却为雌性高于雄性，该差别或可归因于青鳉雄鱼中所存在的正反馈调控。青鳉 NPPv 中 kisspeptin 神经元群分布既不表现性别二态性，亦对性类固醇激素不敏感，因此，NPPv 中的 Kiss1 神经元可能不参与 BPG 轴调控，且在功能上有别于 NVT 的 Kiss1 神经元群。此外，若在繁殖期间给予长光照射，雌、雄性青鳉 NVT 中 Kiss1 神经元的数量将均显著高于非繁殖期间短光照射时 Kiss1 神经元的数量。所有这些结果均显示，青鳉 Kiss1 神经元参与了生殖功能的中枢神经调控（Kanda et al, 2008）。有趣的是，Kitahashi et al（2009）还在斑马鱼和青鳉的缰核中发现了参与生殖调控的另一类 Kiss1 神经元群，并命名为 Kiss2 神经元，这类神经元能表达 *kiss1* 同源平行进化基因，且由于在其它硬骨鱼类，如欧洲海鲈中也鉴定了 Kiss2 的存在，因此，kisspeptin 及其相关肽的功能变得更加多样化。进化分析表明，*kiss2* 似乎只存在于低等脊椎动物，目前，在高等脊椎动物中尚未发现 *kiss2* 的存在，有学者认为 *kiss2* 在进化过程中被丢失（Felip et al, 2009）。Li et al（2009）用定量 Real-time PCR 分析显示，金鱼 *kiss1* 在视顶盖—丘脑、肠道、肾和精巢等高度表达，而 *kiss2* 则主要表达于下丘脑、端脑、视顶盖、脂肪组织、肾、心以及性腺等。Selvaraj et al（2010）对日本鲭的定量 Real-time PCR 组织分布分析显示，*kiss1* 和 *kiss2* 在成年日本鲭的不同组织中都有表达，且这两种转录本在脂肪组织中的表达水平均呈现性别二态性。Shahjahan et al（2010）发现星点东方鲀 *kiss2* 广泛表达于脑、垂体和性腺等。Yang et al（2010）发现金鱼 *kiss1* 虽广泛表达于各种组织，但垂体水平的 *kiss1* 转录本则仅定位于生长激素细胞，而未见于催乳激素细胞或促性腺激素细胞。Servili et al（2011）报道斑马鱼 *kiss1* 和 *kiss2* 分别表达不同的产物，同时，免疫组织化学结果也验证了原位杂交数据，显示 *kiss1* 表达神经元仅定位于缰核，而 *kiss2* 表达神经元则定位于下丘脑背侧和腹侧。*Kiss1* 表达细胞仅伸入至脚间核和中缝核，且这些核中均具高丰度表达 Kiss1 的受体，相反，*kiss2* 表达细胞多存在于下丘脑背侧和腹侧，并广泛伸入至大脑皮层下层、视前区、丘脑、下丘脑的腹侧和尾端以及中脑，且所有这些区域均强烈表达 *kiss2* mRNA。大量 Kiss2 神经纤维支配着前脑腹侧，与 GnRH3 神经元接触密切，从而确立了斑马鱼脑中来自进化上古老 *kiss* 基因的两种独立 kisspeptin 系统结构。Kanda et al（2012）再次验证了金鱼中 Kiss1 和 Kiss2 的存在，并发现 Kiss1 表达神经元主要定位于缰核，Kiss2 表达神经元主要定位于侧结节核（nucleus lateralis tuberis; NLT）和侧隐核（nucleus recessus lateralis; NRL）。最近，Ogawa et al（2013）对鱼类 kisspeptin 系统解剖学进行了综述，为进一步认识鱼类多 kisspeptin 系统（Kiss1 和 Kiss2 系统）的生理和进化意义提供了较为全面的资料。

3　鱼类 Kisspeptin 分子多态性

Kisspeptin 是生殖神经内分泌调控中的新调控因子，在脊椎动物中，*kiss* 基因的数目变化范围为 0~3。Kisspeptin 分子多态性不仅表现于 *kiss* 所编码的前激素原氨基酸组成的差别，也表现于前激素原及功能性成熟肽的长度差异。研究发现（Ohtaki et al, 2001; Akazome, 2010），人类 Kisspeptin 成熟肽存在 Kisspeptin-54、-14、-13、-10 四种主要分子形态，同时，在其它脊椎动物中还存在 Kisspeptin-15 和 -12。在鱼类中，Kanda et al（2008）首次从青鳉中分离了编码 Kisspeptin 的 *kiss1* cDNA，该基因编码 100 个氨基酸的前激素原，在氨基酸水平仅有 10 个氨基酸核心序列（KISS1-10），该核心序列在青鳉和哺乳动物 Kisspeptin 之间保守。Kitahashi et al（2009）在青鳉和斑马鱼中发现的编码 Kisspeptin 的新型基因 *kiss2* 则分别编码序列长为 125 和 115 个氨基酸残基的多肽，其预测的 10 个氨基酸核心序列为 FNYNPFGLRF-NH2，而青鳉和斑马鱼 Kiss1 的核心序列为 YNLNSFGLRYNH2，即，*kiss1* 和 *kiss2* 的表达产物中仅只有-N-N-FGLR-基序相同，进一步分析显示，Kiss2 为 RF-酰胺化合物，Kiss1 为 RY-酰胺化合物，而灵长类的 Kisspeptin 却为 RF-酰胺化合物。目前，Kiss1 多为 RY-酰胺型化合物而 Kiss2 则为 RF-酰胺型化合物的原因尚不明确。Selvaraj et al（2010）报道，日本鲭 Kiss1 和 Kiss2 cDNA 分别编码含 105 和 123 个氨基酸的多肽，其所推导的氨基酸序列与其他脊椎动物作相应的序列比较后显示，高度保守序列仅存在于 kisspeptin-10 区域

（Kp-10），日本鲭 *kiss1* 表达的 Kp-10（YNFN SFGLRY）和 *kiss2* 表达的 Kp-10（FNFNPFG LRF）存在三个氨基酸的不同。Lee et al（2009）报道鱼类存在两种形式的 *kisspeptin* 基因分别编码 Kiss-1 和 Kiss-2，而非洲爪蟾则具有三种形式的 *kiss* 基因分别编码 Kiss-1a, Kiss-1b 和 Kiss-2。同时，非哺乳动物 *kiss1* 基因为哺乳动物 *kiss1* 基因的同源基因，而 *kiss2* 基因则为一种新的形式，且在非洲爪蟾脑中编码一个 C-端酰胺化的十二肽（dodecapeptide），该结果首次确定了成熟形式 Kiss-2 产物于脊椎动物脑中的存在。Felip et al（2009）报道了硬骨鱼欧洲海鲈的两种不同 *kiss* 基因，即 *kiss1* 和 *kiss2*，并发现 *kiss1* 编码的多肽与啮齿类 kisspeptin-10 完全相同，预测的 Kiss2 十肽（FNFNPFGLRF）则存在四个氨基酸的不同。Kitahashi et al（2009）还在鸭嘴兽（*Ornithorhynchus anatinus*）中鉴定了两种推断性的 kisspeptin。Shahjahan et al（2010）报道，星点东方鲀 Kiss2 前体含有 104 个氨基酸残基，并具有一个推断的 kisspeptin-12 肽（SKFNLNPFGLRF）。Mechaly et al（2011）通过分析塞内加尔鳎 *kiss2* 基因结构，发现了其 Kiss2 的两种不同剪接体，即 Ss Kiss2-v1（该剪接体产生功能性的蛋白质）和 Ss Kiss2-v2（该剪接体编码平末端非功能性的蛋白质），且与其它鱼类相反，在该鱼中仅存在 *kiss2*。此外，还有研究（Moon et al, 2009）报道了人工合成的在 C-端具有苯丙酰胺残基的人类 kisspeptin-10（h-Kiss-10F）和非洲爪蟾 kisspeptin 多肽（x-Kiss-12Y）。

4 Kisspeptin 调控鱼类生殖内分泌的功能多样性

分析显示，kisspeptin 涉及以及所推断的功能，实质上涵盖了生殖生理的各个方面，包括调控大脑性别分化、青春期启动定时、通过刺激 GnRH 神经元所实施的对促性腺激素分泌的动态调控、传导性类固醇激素的负馈调控、雌激素正反馈调控下的排卵前促性腺激素分泌高峰、生殖代谢调控、环境因子介导（特别是光周期对生殖功能的调控）等（d' Anglemont et al, 2010; Oakley et al, 2009; Pineda et al, 2010; Roa et al, 2008; Tena et al, 2012）。

4.1 Kisspeptin 调控鱼类青春期启动

Kisspeptin 调控高等脊椎动物青春期启动的文献相对较多，并已形成了 Kisspeptin 调控青春期启动和青春期发育的共识。Parhar et al（2004）首次提出 Kisspeptin/GPR54 系统参与鱼类生殖调控和青春期启动。Carrillo et al（2009）认为 Kisspeptin 系统、促性腺激素释放激素、滤泡刺激素 FSH、11-KT 和瘦素（Leptin）是欧洲海鲈青春期启动的潜在因子。Beck et al（2012）报道，外源性 Kisspeptin 不同程度地加快了鲈鱼（*Morone chrysops* 和 *Morone saxatilis*）的青春期启动及发育，并在幼鱼精巢中呈现出以精子为主体的增加，该发现首次在鱼类中描述了由 Kisspeptin 介导的鱼类青春期启动。Zmora et al（2012）也发现条纹鲈中，Kiss1 和 Kiss2 在青春期前、后的表达存在差别。在脊椎动物中，Kisspeptin 被认为在调控青春期启动中起着主要作用，然而，由于脊椎动物群体的高度多样性以及现有资料的有限性，Kisspeptin 在鱼类中的功能以及该激素与其它激素的整合关系，目前尚不明确。大量资料显示，Kisspeptin 通路对青春期启动及发育存在多重且复杂的调控机制，在整个青春期过渡期，不仅涉及到下丘脑 Kisspeptin 节律和 Kisspeptin/GPR54 传导系统效率的提高，还涉及到 Kiss1 神经元的巨大变化，这种变化表现在 Kiss1 神经元数量的增加和与 GnRH 神经元突轴联系的增加（Pineda et al, 2010; Tena, 2010）。目前的研究显示，Kisspeptin/GPR54 通路涉及到了斑马鱼、鲻鱼（*Mugil cephalus*）、黑头呆鱼（*Pimephales promelas*）、罗非鱼和军曹鱼（Cobia）等的青春期启动及发育（Martinez-Chavez et al, 2008; Mohamed et al, 2007; Biran et al, 2008; Filby et al, 2008; Nocillado et al, 2007; Akazome et al 2010）。但是，Kisspeptin 在鱼类青春期发育成熟中的主要作用位点和机制尚不完善，需要进一步研究充实。

4.2 Kisspeptin 介导鱼类性类固醇激素对促性腺激素分泌的反馈调控

越来越多的证据显示，Kisspeptin 参与脊椎动物性类固醇激素对促性腺激素分泌的反馈调控。Kisspeptin 神经元被认为在调控下丘脑-垂体-性腺轴的上游 GnRH 神经元中起重要作用。有学者认为 Kisspeptin 神经元正是生殖内分泌学苦苦寻找的 HPG 轴中性类固醇激素正负反馈环中失去的联系（missing link）（Gottsch et al, 2009）。Kanda et al（2012）在金鱼中发现，卵巢雌激素能明显调控视前区 Kiss2 神经元中的 *kiss2* 基因表达，且双重原位杂交显示这些神经元可表达雌激素的三种受体，因

此推测，在鱼类中， Kiss2 有可能参与性类固醇激素的反馈调控，而哺乳动物在 *kiss2* 被丢失后，*kiss1* 在类固醇反馈调控中发挥作用。有资料显示, 青鳉鱼切除卵巢后，NVT 中 Kiss1 神经元数量显著减少，用雌二醇处理则可完全逆转该效应，提示 Kiss1 神经元参与了 BPG 轴中性类固醇激素的正反馈调控（Oka, 2009）。同时，青鳉鱼 NPPv 中 Kiss1 神经元对雌二醇不敏感，说明 NPPv 中的 Kiss1 神经元还具有生殖以外的其它功能。斑马鱼幼鱼经雌二醇处理后，下丘脑中 Kiss2 神经元数量增多，且 *kiss1* mRNA 表达丰度显著增加，但增幅度低于 *kiss2*（Servili et al, 2011）。此外，赤点石斑鱼在 17α-甲基睾酮诱导性逆转期间，处理第一周的 *kiss2* 表达量降低，但在处理后第四周表达量显著升高，且与下丘脑 GnRH1 的升高同步（Shi et al, 2010）。此外，斑马鱼对雌二醇敏感的 Kiss2 神经元群和青鳉鱼对雌二醇敏感的 Kiss1 神经元群有着相同的分布定位。这些证据均强烈提示，Kisspeptin 参与了鱼类性类固醇激素的反馈调控。

4.3　Kisspeptin 调控鱼类生殖表现不同的生物学活性

鱼类 Kisspeptin 存在两种形式的 10 肽，即 Kiss1-10 和 Kiss2-10，目前，已有不少与鱼类中编码 Kisspeptin 的两种 10 肽核心序列生物学活性相关的研究，包括欧洲海鲈（Felip et al, 2009）、斑马鱼（Kitahashi et al, 2009）和金鱼（Li et al, 2009）等。在性成熟金鱼中，腹腔注射 Kiss1 可明显升高血清 LH 的水平，而 Kiss2 则不然（Li et al, 2009）。雌性青鳉脑区 NVT 中 *kiss1* 基因的表达对雌激素较敏感（Kanda et al, 2008）。因此，Kiss1 在青鳉和金鱼中是调控 BPG 轴的关键因子。在某些鱼类中，Kiss2 也参与了生殖调控，例如，Felip et al（2009）发现，对欧洲海鲈注射 Kiss1 和 Kiss2 后，Kiss2 引起的血清中 LH 的升高是注射前的四倍，而 Kiss1 仅为两倍; Kiss2 引起的血清 FSH 的升高是注射前的两倍，而 Kiss1 则不能引起血清 FSH 显著升高；性成熟雄性鲈鱼经 Kisspeptin 处理后，仅 Kiss2 能引起血清 LH 的升高，而 Kiss1 则不能。而由于在刺鱼、河豚、红鳍东方鲀、塞内加尔鳎及斜带石斑鱼等鱼类中缺乏 Kiss1，因此推测，Kiss2 可能在这些鱼类中起生殖调控作用。最近，已有学者采用 Kiss110 肽来探讨 Kisspeptin 与鱼类 GPR54 多种受体的亲和力（Li et al, 2009; Felip et al, 2009; Biran et al, 2008），也证实较长的 Kisspeptin 对 GPR54 受体的亲和力要高于较短的 Kisspeptin。配体受体选择性研究则显示，15 肽（Kisspeptin-15）是鱼类和非洲爪蟾 GPR54-1 受体的最有效配体（Lee et al, 2009; Um et al, 2010）。同时，Kisspeptin 成熟肽与 GPR54 受体的结合中，来自 Kiss1 的成熟肽激活 GPR54-1 受体的效果要优于来自 Kiss2 的成熟肽，焦谷氨酰胺化的 Kiss1-15 肽（Kisspeptin-15）结合斑马鱼 GPR54-1 受体和非洲爪蟾 GPR54-1b 受体的亲和力最强，而非洲爪蟾 Kiss1a-14 肽（Kisspeptin-14）结合非洲爪蟾 GPR54-1a 受体的亲和力最强。另外，在鱼类中，来自 Kiss1 较短的 10 肽（Kisspeptin-10）相对于较长的 Kisspeptin 成熟肽，对 GPR54-1 受体的亲和力要低得多。此外，在鱼类和非洲爪蟾中，Kiss2-12 肽及 Kiss2-10 肽对 GPR54-2 多种受体具有相同的亲和力，同时，Kiss2-12 肽及来自 Kiss1 的多种肽对 GPR54-2 多种受体的亲和力也无明显差别。另外，人工合成的非洲爪蟾 Kiss2-12 肽，在 C-端苯丙氨酸被酪氨酸替换后，将表现对非洲爪蟾 GPR54-2 和牛蛙（*Rana catesbeiana*）GPR54-2 的最高亲和力（Moon et al, 2009; Lee et al, 2009）。

4.4　Kisspeptin 对鱼类季节性繁殖的生殖内分泌调控

大多数鱼类繁殖表现明显季节性，且受环境中光和温度等因子的调控。越来越多的证据显示 Kisspeptin 参与了鱼类季节繁殖的生殖内分泌调控。Selvaraj et al（2010）认为日本鲭脑中的两个 *kiss* 基因均参与了季节性性腺发育调控。Migaud et al（2012）证实雄性欧洲海鲈中的 Kiss1 和 Kiss2 表达具明显季节性，且其升高与 FSHβ 和 LHβ 的升高同步，与精子、卵子发生及成熟存在必然联系。Ando et al（2013）探讨了星点东方鲀月光相关性产卵和排精的分子内分泌基础，结果发现，性成熟期间，雌、雄鱼的 *kiss2* 表达在众多基因中占主导地位，从配子发生早期至产卵前、后，*kiss* 基因表达均显著升高，且雌鱼 Kisspeptin 的表达量要高于雄鱼，说明 Kisspeptin 在卵巢发育成熟和排卵中起重要作用。Zmora et al（2012）发现在条纹鲈性成熟期，两种基因表达均剧烈升高，青春期 Kiss2 肽升高血浆 LH 水平及调控 GnRH1 表达的效果均优于 Kiss1，而性腺发育恢复期（recrudescence）Kiss1 肽升高血浆 LH 水平及调控 GnRH1 表达的效果上要强于 Kiss2，因此，条纹鲈 Kiss1 和 Kiss2 在调控生殖中

的作用不同，且具性腺周期依赖性。Kanda et al（2012）发现，雌、雄金鱼Kiss2在繁殖季节的表达量均显著高于非繁殖季节。

4.5 Kisspeptin调控鱼类性腺发育成熟

研究表明，斑马鱼Kisspeptin在孵化后第一周表达量很低，雌性表达量逐渐升高，并在受精后第十二周达到高峰，此时发育完成，卵细胞成熟，而雄性表达量则在受精后第六周达到高峰，与精子发生第一期相吻合，此后，表达下降（Biran et al, 2008），该结果提示，Kisspeptin与斑马鱼雌、雄性腺发育成熟密切关联。Clarkson et al（2008）也认为Kisspeptin/GPR54信号传递对于排卵前GnRH神经元的激活以及LH分泌高峰的产生是必不可少的。Shahjahan et al（2010）认为星点东方鲀Kiss2通过Kiss2/GPR54系统刺激GnRH1的分泌，对于在产卵期调控生殖功能起重要作用。Selvaraj et al（2012）发现，在卵巢最后成熟和排卵过程中，鲭亚目（Scombroid）鱼类脑中的Kisspeptin和各种GnRH表达均升高，日本鲭（*S. japonicus*）脑中的*kiss1*及*kiss2* mRNA表达水平在卵黄发生晚期很低而在GVM（germinal vesicle migration）期间显著升高，*kiss1* mRNA表达水平在卵水合期显著下降而在排卵期和排卵后期再次升高，相反, *kiss2* mRNA表达水平在排卵期和排卵后期显著下降，从而提示，雌鲭鱼中存在Kisspeptin和GnRH参与FOM（final ovarian maturation）和排卵的调控。Mechaly et al（2012）报道了塞内加尔鳎在整个生殖周期中Kisspeptin等基因表达的变化，结果发现，Kisspeptin及其受体表达存在时空及性别差异，且Kiss2是雄鱼性腺发育启动的主要调控因子，而Kiss2是雌鱼卵巢成熟的重要调控因子，*kiss2*和Kiss2受体基因表达在产卵季节前或在产卵季节达到最高。Beck et al（2012）发现，Kisspeptin处理性成熟白鲈（*Morone chrysops*）和条纹鲈可增加性腺重量、性体指数和精子细胞压积，并使得白鲈卵细胞发育提前，且这些性腺改变发生在缺少任何光温调控和激素注射的情况下，为未来在不同鱼类中研究和验证Kisspeptin系统奠定了分子基础。

4.6 Kisspeptin调控GnRH和促性腺激素的分泌

Kisspeptin可通过Kiss/GPR54系统激活GnRH神经元从而调控GnRH的合成和释放（Gottsch et al, 2004; Messager et al, 2005; Shahab et al, 2005）。极低剂量Kisspeptin可显著促进LH的分泌（Gottsch et al, 2004; Irwig et al, 2005; Messager et al, 2005;Navarro et al, 2004; Plant et al, 2006; Shahab et al, 2005），同时，该促分泌作用，可通过GnRH拮抗物预处理而消除，从而证实Kisspeptin通过调控GnRH 神经元而调控生殖轴 （Gottsch et al, 2004; Irwig et al, 2005）。Kiss1-10可显著促进发育中、早期黑头呆鱼幼鱼脑中*gpr54-2b* 和*gnrh3*基因的表达（Filby et al, 2008）。斜带石斑鱼基因组仅含 *kiss2*，用 Kiss2-10肽处理性成熟雌鱼可显著促进下丘脑*gnrh1*基因的表达（Shi et al, 2010）。在垂体水平，Kisspeptin诱导能够促进基因表达及激素分泌。例如，Kiss2-10可诱导雌性斑马鱼FSHβ和LHβ亚单位表达量的升高（Kitahashi et al, 2009）；Kiss2-10诱导青春期前欧洲海鲈LH和FSH释放的效果优于Kiss-10，同时，还可引起青春期雄鱼LH的分泌（Felip et al, 2009）；Kiss1-10可显著升高金鱼血液中的LH水平，且呈剂量依赖性（Li et al, 2009），此外，Kiss1-10还能够促进催乳激素和生长激素的分泌（Yang et al, 2009）。有学者认为，Kisspeptin是促性腺激素分泌的主要调控因子（Tena, 2010）。Mechaly et al（2011）用特异性定量PCR分析显示，在整个成熟期，塞内加尔鳎Kiss2的两种亚型在脑和性腺中的表达变化均存在差异，同时，Ss Kiss2-v1 mRNA在下丘脑中的快速升高，会导致垂体LH和FSH mRNA表达水平的同步升高。然而，在垂体水平，Kisspeptin对LH 分泌的调控作用仍存在争论，有研究显示，Kisspeptin能直接刺激垂体LH的释放（Gutiérrez et al, 2007; Suzuki et al, 2008），而另外一些学者则持相反意见（Matsui et al, 2004; Smith et al, 2008）。值得指出的是，Pasquier et al（2011）观察到欧洲鳗鲡（*Anguilla anguilla*）Kiss受体在垂体有高丰度表达，并认为Kisspeptin有可能直接作用于垂体，然而，Kisspeptin却抑制了LH的分泌。

5 Kisspeptin调控鱼类生殖内分泌的机制

Biran et al（2008）分别用人及斑马鱼的Kisspeptin-10作为配体研究斑马鱼两种GPR54受体的信号传导路径，结果显示，GPR54-1主要通过PKC信号传导通路传导Kisspeptin活性，且该信号传导类似于哺乳动物 Kisspeptin 的信号传导通路（Kotani et al, 2001），而GPR54-2则可通过PKC或PKA信号通路来传导信号，实施功能调控。此外，人及斑马鱼的Kisspeptin-10均可同时激活斑马鱼的

两种 GPR54 受体和人的 GPR54 受体，同时，Kisspeptin-10 的酰胺化是激活受体的必要条件。Filby et al（2008）在黑头呆鱼中克隆得到 GPR54 受体以及 GnRH2 和 GnRH3 的基因，并对处于早中青春期的黑头呆鱼注射了哺乳动物 Kisspeptin-10，结果发现，涉及到类固醇激素信号通路的基因，如雌激素受体 1（ESR1）、雄激素受体（AR）和 CYP19α2，在青春期启动的鱼脑中表达量均升高，且雌鱼 *GPR54* 基因的表达稍微提前，从而发现了黑头呆鱼 Kisspeptin/GPR54 系统的存在，并认为其青春期性固醇醇激素正反馈调控通过 Kisspeptin-GPR54-GnRH 通路实现。van Aerle et al（2008）也提供了鱼类中存在 Kiss1/Kiss1 受体信号通路的证据，并认为功能性 Kiss1/ Kiss1 受体信号通路在脊椎动物中是保守的。Moon et al（2009）发现，牛蛙 GPR54 对非洲爪蟾 Kisspeptin 高度敏感，并通过 PKC 信号通路特异性报告信号的检测，证实了 Kisspeptin 作为配体的 bfGPR54 受体与 PKC 相联的信号通路。Zhao et al（2012）对 Kisspeptin 调控青鳉成鱼端脑 GnRH3 神经元电活动的全脑电生理研究显示，100 nmol/L Kisspeptin 的简单处理，将对下丘脑外 GnRH 神经元群的电活动产生持续刺激性影响，剂量依赖分析表明，该神经肽的激活范围相对较窄，进一步实验表明，河豚毒素阻断动作电位后，使用低 Ca^{2+}/高 Mg^{2+}溶液阻断突轴传递可抑制Kisspeptin对GnRH神经元电活动的刺激作用，提示 Kisspeptin 可通过轴突间接调控端脑 GnRH 神经元的兴奋作用。Kisspeptin 神经元表达雌、雄激素受体，且在雌、雄个体中均为性类固醇激素直接作用的靶细胞。脑中 Kisspeptin 信号通路参与介导促性腺激素分泌的负反馈调节，产生排卵前的 GnRH/LH 高峰，在青春期触发和指导性成熟节律，控制季节性生殖并在哺乳期抑制生殖活动，Kisspeptin 信号通路可能在经典的生殖神经内分泌领域以外同时行使其他功能（Oakley et al, 2009）。Oakley et al（2009）提出，Kisspeptin 与 GPR54 结合后，激活 G 蛋白激活的磷酸酯酶 C（PLCβ），通过 Gαq/11 介导的信号通路，进行 Kisspeptin 信号传递，PLCβ 激活后生成胞内第二信使，即三磷酸肌醇（IP3）和甘油二酯（DAG）将分别介导胞内 Ca^{2+} 的释放和蛋白激酶 C（PKC）的激活。Zhang et al（2008）认为第二信使产生后，DAG 和（或）Ca^{2+} 进一步激活瞬间受体电位通道蛋白（transient receptor potential canonical channel，PRPC）和抑制内向整流性钾通道（rectifying potassium channels）从而介导 Kisspeptin 刺激 GnRH 的分泌。

6　Kisspeptin 的分子进化

人类 Kiss1 基因编码含有 145 个氨基酸的蛋白质前体，该前体经过酶催化裂解成氨基酸长度为 -54、-14、-13 或-10 的多肽（Ohtaki et al, 2001），在其他动物中还发现了 Kisspeptin-15 和 Kisspeptin-12 的存在。C-端的十肽即 Kisspeptin-10 相当于转移抑制因子蛋白序列 45～54 位氨基酸（metastin 45-54），是保持生物效应的最短序列，哺乳动物 Kisspeptin-10 除 C-末端酰基化氨基酸外，高度保守。斑马鱼和青鳉 Kiss1 与啮齿类动物 Kisspeptin-10 相比仅只有在第 3 位的一个氨基酸不同，而河豚 Kisspeptin-10 出现了在第 1、3 和 5 位氨基酸的替换（van Aerle et al, 2001）。之后，相继在七鳃鳗、姥鲨（、斑马鱼、青鳉、欧洲海鲈、非洲爪蛙（*Xenopus laevis*）、非洲爪蟾及鸭嘴兽等水生动物中确立了 Kiss2 的存在（Um et al, 2010）。Shahjahan et al（2010）发现星点东方鲀 Kiss2 的前体含有 104 个氨基酸残基，并具有一个推断 Kisspeptin-12 肽（SKFNLNPFGLRF）。此外，还在非洲爪蟾中发现了 Kiss1b（Lee et al, 2009），这些序列的氨基酸比对显示，Kiss1 及 Kiss2 在脊椎动物中除 C-末端十肽高度保守外，蛋白前体的其它部分均存在高度变异。因此，Kiss1 和 Kiss2 的分类主要依据 C-末端氨基酸序列。Kiss1 十肽在 C-末端具有一个酰胺化的酪氨酸残基或苯丙氨酸残基，并在第 3 位表现变异，鱼类中亮氨酸替换了第 3 位氨基酸，非洲爪蟾 Kiss1b 则是缬氨酸替换了第 3 位氨基酸，其它脊椎动物则是色氨酸替换第 3 位氨基酸，如非洲爪蟾 Kiss1a 第 3 位氨基酸即为色氨酸。此外，鱼类 Kiss1 和非洲爪蟾 Kiss1b 蛋白前体中，与 10 肽相邻的氨基酸序列与其它脊椎动物的氨基酸序列存在很大差异，不仅如此，鱼类 Kiss1 和非洲爪蟾 Kiss1b 的蛋白质前体 10 肽上游处具有一个 5 位氨基酸的双碱基位点，这些双碱基氨基酸紧随着一个谷氨酸，表明鱼类 *kiss1* 基因和非洲爪蟾 *kiss1b* 基因可编码一个含有 15 个氨基酸的成熟肽，该 15 肽在 N-端具有焦谷氨酰基化和 C-端酪氨酰胺化位点。这些 15 肽（pentadecapeptides）是鱼类和非洲爪蟾 GPR54-1 最有效的激活因子（Lee et al, 2009）。Kiss2

十肽的氨基酸序列与Kiss1氨基酸序列分别在第1、3和5位存在3个氨基酸的差异。此外，一个碱性氨基酸即精氨酸出现在Kiss2十肽上游的3位氨基酸处，表明每种Kiss2 cDNA编码一个新的12肽，其C-端的苯丙氨酸可以酰胺化（Lee et al, 2009），免疫亲和纯化在非洲爪蟾脑中证实Kiss2十二肽的存在（Um et al, 2010），同时，非洲爪蟾的Kiss1a通过C-端的酰胺化产生一个14肽（Um et al, 2010）。Kanda et al（2012）通过对金鱼Kiss1和Kiss2的进化分析后，认为Kiss1和Kiss2具有共同的进化起源，当Kiss2在哺乳动物中丢失以后，Kiss1在类固醇反馈调控中发挥作用。

7 Kisspeptin与其他功能分子对鱼类生殖内分泌的协同调控

7.1 Kisspeptin与速激肽的协同调控

速激肽（tachykinin）是一个神经肽类家族，包括P物质（SP）、神经激肽A（neurokinin A;NKA）、神经激肽B（neurokinin B；NKB），分别由*tac1*基因（编码SP与NKA）和*tac2/3*基因（编码NKB）所编码。速激肽广泛分布于中枢神经系统，起着神经递质和神经调控因子的作用。最近的研究显示，NKB和Kisspeptin存在共表达，在生殖调控中起协同调控作用。有证据显示，神经激肽B是生殖神经内分泌的又一关键调控因子（Blaustein et al, 2010）。还有研究发现，弓形核KNDy（kisspeptin/neurokinin B/dynorphin）神经元介导雌二醇的负反馈调控，同时还显示，Kisspeptin、NKB和强啡肽（dynorphin）是促进LH分泌并诱导LH分泌高峰的关键调控因子（Merkley et al, 2012）。目前，速激肽和Kisspeptin之间的关联在鱼类中报道较少，Ogawa et al（2012）认为斑马鱼脑中的Kisspeptin和NKB这两个生殖调控的关键因子存在着独立的传导通路。鱼类Kisspeptin与速激肽对生殖内分泌的协同调控有待深入研究。

7.2 Kisspeptin与褪黑激素的协同调控

资料显示，Kisspeptin作为光周期介导因子与褪黑激素（melatonin）共同实施光周期对鱼类生殖的协同调控（Tena et al, 2012）。越来越多的证据显示，光周期对生殖的调控涉及到Kisspeptin的直接和间接作用，且作为褪黑激素作用的介导因子，Kisspeptin在生殖的季节性调控中起中心作用（Revel et al, 2007）。在众多环境因子中，光周期是最难改变的地理物理因子，因此，大多数季节性繁殖动物均以此来预测季节改变并启动雌、雄配子的发生和确定产卵时间。然而，动物如何获得每日和季节性改变的日长信息，并如何通过BPG轴进行信息传递，目前还缺乏深入了解（Tena et al, 2012）。有证据显示，褪黑激素在介导光周期调控垂体功能的神经内分泌通路中起中心作用并调控生殖的季节性，褪黑激素周期性的生成如同生物钟和日历，光周期决定褪黑激素信号的时间长度，而温度则影响褪黑激素信号的幅度，两者精确定义了日周期和年周期（Reiter, 1993）。有证据显示，弓状核*kiss1*基因的表达受褪黑激素调控，Kisspeptin处理将重新激活光周期抑制动物的生殖活动（Simonneaux et al, 2009）。然而，目前还不清楚褪黑激素是否通过直接作用于弓状核Kiss1神经元而介导其作用。Greives et al（2008）认为，Kisspeptin通过直接改变*kiss*表达及改变Kiss1对性类固醇激素反馈调节的敏感性，来介导褪黑激素信号通路。在罗非鱼中，长光周期抑制青春期启动及Kisspeptin受体表达（Martinez et al, 2008）。Kanda et al（2008）报道，光周期与青鳉*kiss1*基因表达间存在显著相关，表现为长光周期诱导NVT中Kiss1神经元的数量要高于短光周期。作为中间系统，GnRH神经元可整合和处理松果体所接受的光周期信息，Carnevali et al（2011）在斑马鱼中也证实，光周期调控生殖通过褪黑激素的夜间释放而实现。原位杂交显示斑马鱼和鲈鱼的Kiss1神经元存在于缰核，这一组织学定位提示，Kiss1神经元极有可能肩负着环境和代谢信号的感觉职能（Escobar et al, 2010; Escobar et al, 2011; Servili et al, 2011）。对斑马鱼褪黑激素作用的研究还显示，褪黑激素能引起脑中*kiss1*、*kiss2*和*gnrh3*基因转录本的升高，以及*lhβ*的同步升高，且该升高与褪黑激素所诱导的生殖力增加密切相关（Carnevali et al, 2011）。所有这些结果均提示，褪黑激素有可能通过信号机制来调控鱼类生殖，并通过Kisspeptin通路信号链刺激下丘脑GnRH神经元开启BPG轴，从而揭示，光周期通过褪黑激素调控Kiss1神经元，从而驱动生殖轴实现Kisspeptin与褪黑激素协同调控鱼类生殖。

7.3 Kisspeptin与Leptin、Ghrelin和NPY代谢信号对生殖的协同调控

大量代谢应激模型研究显示，代谢应激对生殖有强烈抑制作用，代谢应激时，Kisspeptin表达被

显著抑制。在能量平衡中起关键作用的 Leptin、Ghrelin 和 NPY 直接或间接抑制 *kiss* 基因表达（Pineda et al, 2010）。目前，鱼类能量状态和代谢因子对 Kisspeptin 表达的影响还未十分明了，Mechaly et al（2011）发现，禁食可引起塞内加尔鳎 *kiss2*mRNA 表达显著升高，且该升高与垂体中 LHβ 和 FSHβ 的升高同步，从而为 Kiss2 参与鱼类生殖能量代谢调控提供了第一证据。然而，Kisspeptin 对鱼类生殖代谢的调控仍有待进一步研究。

8 展望

目前，生殖神经内分泌研究的三大热点为：雌二醇的作用神经机制（neural mechanisms of action of estradiol）、GnRH的调控（GnRH regulation）及生殖神经内分泌表观遗传学（epigenetics of reproductive neuroendocrinology）（Blaustein, 2010）。这三大热点为研究者提供了新视野，特别是在GnRH调控领域中，Kisspeptin是生殖内分泌的重要角色，神经激肽B是参与青春期启动和生殖调控的又一关键因子，而促性腺激素抑制激素（GnIH）的发现以及RF酰胺-相关肽（RFamide-related peptide）作为GnIH对促性腺激素神经元的直接调控作用引起了鱼类生殖内分泌研究的兴趣，也为鱼类生殖内分泌研究提供了新的空间。Kisspeptin的发现给经典神经内分泌学带来了一场革命，国内、外很多学者相继跻身这一领域。2005年，Seminara（2005）在《临床内分泌与代谢杂志》上以“我们所有人应记住我们的第一个吻”为题发表了编辑部文章，激发了广大研究者的兴趣，之后，Kauffman（2010）于2010年发表了题为“Kisspeptin时代的来临”的文章，并对Kisspeptin在性别差别、发育和青春期启动所起的作用进行了综述，从而在全世界吹响了研究Kisspeptin的号角。根据现有资料，Kisspeptin在鱼类中一些功能才突显雏形，一些还未明了，有待进一步深入研究，同时，不同鱼类之间还表现Kisspeptin的功能差异性，特别是Kisspeptin对鱼类生殖的调控仍有待进一步实验和数据的验证和补充。值得注意的是，目前，不仅鱼类Kisspeptin对生殖的调控远远滞后于高等脊椎动物的研究，而且在鱼类Kisspeptin有些功能方面还几乎是空白，比如Kisspeptin在发育中如何调控鱼类的性别分化和性别二态性，Kisspeptin如何参与能量平衡和生殖整合，以及Kisspeptin如何通过调控生殖轴而整合生长轴等。

致谢：感谢张为民教授、张勇博士及李水生博士对本文的支持和关注，感谢张辉贤博士在文献查阅上提供的大力帮助。

参考文献：

Akazome Y, Kanda S, Okubo K, Oka Y. 2010. Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. *Journal of Fish Biology,* **76**（1）: 161-182.

Ando H, Shahjahan M, Hattori A. 2013. Molecular neuroendocrine basis of lunar-related spawning in grass puffer. *General and Comparative Endocrinology,* **181**: 211-214.

Beck BH, Fuller SA, Peatman E, McEntire ME, Darwish A, Freeman DW. 2012. Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology,* **162**（3）: 265-73.

Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biology of Reproduction,* **79**（4）: 776-786.

Blaustein JD. 2010. The Year in Neuroendocrinology. *Molecular Endocrinology,* **24**（1）: 252-260.

Carnevali O, Gioacchini G, Maradonna F, Olivotto I, Migliarini B. 2011. Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PLoS One,* **6**（5）: e19978.

Carrillo M, Zanuy S, Felip A, Bayarri MJ, Molés G, Gómez A. 2009. Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish: the case of sea bass. *Annals of the New York Academy of Science,* **1163**: 49-59.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. 2008. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the Luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience,* **28**（35）: 8691-8697.

d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. 2010. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology,* **25**（4）: 207-217.

d' Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **104**（25）: 10714-10719.

Escobar S, Servili A, Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Kah O. 2011. Characterization of the kisspeptin systems in the brain of the European sea bass（*Dicentrarchus labrax*）: relationships with oestrogen receptors. *Indian Journal of Science and Technology,* **4**（8）: 23-24.

Escobar S, Servili A, Felip A, Espigares F, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M, Kah O. 2010. Neuroanatomical characterization of the kisspeptin systems in the brain of European sea bass(*D. labrax*). *In*: 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pècs, Hungary, p90（Abstracts Book）.

Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gómez A. 2009. Evidence for two distinct *KiSS* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology,* **312**（1-2）: 61-71.

Filby AL, van Aerle R, Duitman J, Tyler CR. 2008. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biology of Reproduction,* **78**（2）: 278-289.

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **312**（4）: 1357-1363.

Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2009. From *KISS1* to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides,* **30**（1）: 4-9.

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology,* **145**（9）: 4073-4077.

Greives TJ, Humber SA, Goldstein AN, Scotti MA, Demas GE, Kriegsfeld LJ. 2008. Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in Siberian hamsters（*Phodopus sungorus*）. *Journal of Neuroendocrinology,* **20**（12）: 1339-1347.

Gutiérrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM, Castano JP. 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology,* **19**（7）: 521-530.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2005. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KiSS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology,* **80**（4）: 264-272.

Kanda S, Karigo T, Oka Y. 2012. Steroid sensitive *kiss2* neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinology,* **24**（6）: 897-906.

Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K, Oka Y. 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually-dimorphic kisspeptin neurons in medaka（*Oryzias latipes*）. *Endocrinology,* **149**（5）: 2467-2476.

Kauffman AS. 2010. Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology,* **324**（1-2）: 51-63.

Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. 2007. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in Neurosciences,* **30**（10）: 504-511.

Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS. 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology,* **150**（2）: 821-831.

Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry,* **276**（37）: 34631-34636.

Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan Y, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. 2007. Kiss1$^{-/-}$ mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54$^{-/-}$ mice. *Endocrinology,* **148**（10）: 4927-4936.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters,* **446**（1）: 103-107.

Lee JH, Welch DR. 1997. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Research,* **57**（12）: 2384-2387.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute,* **88**（23）: 1731-1737.

Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki N, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY, Tsutsui K. 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology,* **150**（6）: 2837-2846.

Li S, Zhang Y, Liu Y, Huang X, Huang W, Lu D, Zhu P, Shi Y, Cheng CH, Liu X, Lin H. 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish（*Carassius auratus*）. *Journal of Endocrinology,* **201**（3）: 407-418.

Martinez-Chavez CC, Minghetti M, Migaud H. 2008. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology,* **156**（2）: 224-233.

Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **320**（2）: 383-388.

Mechaly AS, Viñas J, Piferrer F. 2011. Gene structure analysis of kisspeptin-2（Kiss2）in the Senegalese sole（*Solea senegalensis*）: characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. *Molecular and Cellar Endocrinology,* **339**（1-2）: 14-24.

Mechaly AS, Viñas J, Piferrer F. 2012. Sex-specific changes in the expression of kisspeptin, kisspeptin receptor, gonadotropins and gonadotropin receptors in the Senegalese sole（*Solea senegalensis*）during a full reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology,* **162**（4）: 364-371.

Merkley CM, Porter KL, Coolen LM, Hileman SM, Billings HJ, Drews S, Goodman RL, Lehman MN. 2012. KNDy（kisspeptin/neurokinin B/dynorphin）neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology,* **153**（11）: 5406-5414.

Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **102**（5）: 1761-1766.

Migaud H, Ismail R, Cowan M, Davie A. 2012. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass（*Dicentrarchus labrax*）. *General and Comparative Endocrinology,* **179**（3）: 384-399.

Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA. 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of Molecular Endocrinology,* **38**（1-2）: 235-244.

Moon JS, Lee YR, Oh DY, Hwang JI, Lee JY, Kim JI, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY. 2009. Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides,* **30**（1）: 171-179.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of Biological Chemistry,* **276**（31）: 28969-28975.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology,* **145**（10）: 4565-4574.

Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A. 2007. Temporal expression of Gprotein-coupled receptor 54（GPR54）, gonadotropin-releasing hormones（GnRH）, and dopamine receptor D2（drd2）in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology,* **150**（2）: 278-287.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews,* **30**（6）: 713-743.

Ogawa S, Parhar IS. 2013. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. *General and Comparative Endocrinology,* **181**: 169-174.

Ogawa S, Ramadasan PN, Goschorska M, Anantharajah A, Ng KW, Parhar IS. 2012. Cloning and expression of tachykinins and their association with kisspeptins in the brains of zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology,* **520**（13）: 2991-3012.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. 2001. Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature,* **411**（6837）: 613-617.

Oka Y. 2009. Three types of gonadotrophin-releasing hormone neurones and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurones in teleosts. *Journal of Neuroendocrinology,* **21**（4）: 334-338.

Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor（Gpr54）during maturation in cichlid fish. *Endocrinology,* **145**（8）: 3613-3618.

Pasquier J, Lafont AG, Leprince J, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *General and Comparative Endocrinology,* **173**（1）: 216-225.

Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2010. Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Progress in Brain Research,* **181**: 55-77.

Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ. 2006. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey（*Macaca mulatta*）elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology,* **147**（2）: 1007-1013.

Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. 2008. The role of Kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annual Review of Physiology,* **70**（1）: 213-238.

Reiter RJ. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia,* **49**（8）: 654-664.

Revel FG, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2007. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders,* **8**（1）: 57-65.

Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology,* **29**（1）: 48-69.

Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M. 2010. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two *Kiss* genes in the adult male and female chub mackerel（*Scomber japonicus*）during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology,* **169**（1）: 28-38.

Selvaraj S, Kitano H, Amano M, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M. 2012. Increased expression of kisspeptin and GnRH forms in the brain of scombroid fish during final ovarian maturation and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology,* **10**（1）: 64.

Seminara SB. 2005. We all remember our first kiss: kisspeptin and the male gonadal axis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism,* **90**（12）: 6738-6740.

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine,* **349**（17）: 1614-1627.

Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, Parhar IS, Seong JY, Vaudry H, Kah O. 2011. Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology,* **152**（4）: 1527-1540.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **102**（6）: 2129-2134.

Shahjahan M, Motohashi E, Doi H, Ando H. 2010. Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology,* 169（1）: 48-57.

Shi Y, Zhang Y, Li S, Liu Q, Lu D, Liu M, Meng Z, Cheng CH, Liu X, Lin H. 2010. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biology of Reproduction,* **83**（1）: 63-74.

Simonneaux V, Ansel L, Revel FG, Klosen P, Pevet P, Mikkelsen JD. 2009. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides,* **30**（1）: 146-153.

Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ. 2008. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not

increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology,* **149**（4）: 1951-1959.

Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. 2008. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Science,* **103**（3-4）: 360-365.

Tena-Sempere M. 2010. Roles of Kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset. *Endocrine Reviews,* **17**: 52-62.

Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M. 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology,* **175**（2）: 234-43. ；

Um HN, Han JM, Hwang JI, Hong SI, Vaudry H, Seong JY. 2010. Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences,* **1200**（1）: 67-74.

van Aerle R, Kille P, Lange A, Tyler CR. 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides,* **29**（1）: 57-64.

Yang B, Jiang Q, Chan T, Ko WK, Wong AO. 2010. Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *General and Comparative Endocrinology,* **165**（1）: 60-71.

Zhang C, Roepke TA, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. 2008. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *Journal of Neuroscience,* **28**（17）: 4423-4434.

Zhao Y L, Wayne NL. 2012. Effects of kisspeptin1 on electrical activity of an extrahypothalamic population of gonadotropin-releasing hormone neurons in medaka（*Oryzias latipes*）. *PLoS One,* **7**（5）: e37909.

Zmora N, Stubblefield J, Zulperi Z, Biran J, Levavi-Sivan B, Muñoz-Cueto JA, Zohar Y. 2012. Differential and gonad stage-dependent roles of kisspeptin1 and kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts, morone species. *Biology of Reproduction,* **86**（6）: 177-188.